

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
22 de Septiembre de 2005 (22.09.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/087259 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **A61K 39/00**,
39/04, A61P 37/00, 35/00, 15/00

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CU2005/000002

(22) Fecha de presentación internacional:
18 de Marzo de 2005 (18.03.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
2004-0051 18 de Marzo de 2004 (18.03.2004) CU

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*): **INSTITUTO FINLAY - CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEROS** [CU/CU]; Ave 27 No 19805 e/ 198 y 202 La Coronela - La Lisa, 11000 Ciudad de La Habana (CU). **CENTRO DE QUÍMICA FARMACEÚTICA**. [CU/CU]; Ave 200 y 2 - Atabey, Cubanacán- Playa, 11200 Ciudad de La Habana (CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **SARMIENTO GARCÍA SAN MIGUEL, María, Elena** [CU/CU]; Ave 1ra, No. 1207 Apto 2. e/ 12 y 14 Miramar - Playa, 11300 Ciudad de La Habana (CU). **ACOSTA DOMÍNGUEZ, Armando** [CU/CU]; Ave 1ra, No. 1207 Apto 2. e/ 12 y 14 Miramar - Playa, 11300 Ciudad de La Habana (CU). **VALLIN PLOUS, Carlos, Román** [CU/CU]; Calle 170, BCE-3 Apto 4, e/ 1ra y 5ta Reparto Flores - Playa, 11200 Ciudad de La Habana (CU). **OLIVARES ARZUAGA, Nesty** [CU/CU]; Calle

Martínez No 271 e/ D y E Lawton - 10 de Octubre, 10700 Ciudad de La Habana (CU). **LÓPEZ HERNÁNDEZ, Yamilé** [CU/CU]; Ave 156 No 6920, e/ 69 y 71, La Lisa, 11000 Ciudad de La Habana (CU). **RODRÍGUEZ VALDES, Caridad** [CU/CU]; Calle Chaple No 764, Apto 1 e/ Vía Blanca y Sta Lutgarda, Palatino - Cerro, 12000 Ciudad de La Habana (CU). **MARTÍNEZ BENÍTEZ, Máximo** [CU/CU]; Ave 5ta No 18408, e/ 184 y 186, Playa, 11200 Ciudad de La Habana (CU). **GONZÁLEZ MESA, Leonora** [CU/CU]; Ave 57 No 13607, e/ 136 y 138, Marianao, 11500 Ciudad de La Habana (CU). **INFANTE BOURZAC, Juan, Francisco** [CU/CU]; Ave 29, No 3604 e/ 36 y 42, Playa, 11200 Ciudad de La Habana (CU). **RAMOS MORI, Astrid** [CU/CU]; Zona 12, Edif. H-15, Apto 9 Alamar, Habana del Este, 11900 Ciudad de La Habana (CU).

(74) Mandatario: **VAZQUEZ D'ALVARE, Danice**; Ave 1ra, No 1001 Esq. a 10, Miramar - Playa, 11300 Ciudad de La Habana (CU).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: VACCINE COMPOSITIONS WHICH ARE OBTAINED FROM STREPTOMYCES

(54) Título: COMPOSICIONES VACUNALES OBTENIDAS A PARTIR DE STREPTOMYCES.

(57) Abstract: The invention relates to the field of immunology and, more specifically, to the control of infectious diseases caused by microbacteria, which is based on the use of vaccines for the prevention of said diseases. The inventive vaccines have been developed with the use of live strains of Streptomyces, which may or may not express antigens of *M. tuberculosis*, and have demonstrated their protective capacity against the threat of BCG and *M. tuberculosis* after being administered by different routes. The invention also relates to the use of strains of Streptomyces for the expression of heterologous antigens of vaccinal interest.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología, específicamente con el control de enfermedades infecciosas causadas por micobacterias, basado en el uso de vacunas para la prevención de estas enfermedades. Con la presente invención se desarrollaron vacunas basadas en el uso de cepas vivas de Streptomyces expresando o no antígenos de *M. tuberculosis*, las cuales demostraron su capacidad protectora frente al reto con BCG y *M. tuberculosis* después de ser administradas por distintas vías. Forma parte de la presente invención el uso de cepas de Streptomyces para la expresión de antígenos heterólogos de interés vacunal.



WO 2005/087259 A1



EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones*

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional*

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

COMPOSICIONES VACUNALES OBTENIDAS A PARTIR DE STREPTOMYCES**Campo de la Invención**

La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología, específicamente con el control de enfermedades infecciosas causadas por micobacterias, específicamente con el desarrollo de vacunas basadas en el uso de cepas vivas de *Streptomyces* que expresan o no antígenos de *M. tuberculosis*, las cuales demostraron su capacidad protectora frente al reto con BCG y *M. tuberculosis* después de ser administradas por distintas vías.

Arte Previo

Entre las micobacterias se encuentran patógenos importantes para el hombre y los animales, entre ellas *Mycobacterium tuberculosis* que causa la tuberculosis, *Mycobacterium leprae* el cual es responsable de la lepra, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracelulare* productores de la tuberculosis en pacientes inmunodeprimidos, así como otras micobacterias que con menor frecuencia causan enfermedades en el humano (Somner HM, Good RC. *Mycobacterium*. En: Manual of clinical Microbiology, 4 ed. Washington D.C: An society for Microbiology; 1985. p.216-248., Orme IM. Immunity to mycobacteria. *Current Opinión in Immunology*. 1993; 5: 497-502)

En el caso de los animales, se destacan *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis el cual causa la Enfermedad de Jones en rumiantes y *Mycobacterium bovis*, que causa la tuberculosis del ganado vacuno (Dannenber Am. Patogenesis of tuberculosis: native and acquired resistense in animals and humans. In Leive L, Schelesinger D (eds). *Mycrobiology*. 1984, p344-354).

Entre las enfermedades micobacterianas más importantes en el hombre se encuentra la tuberculosis (TB) que constituye un problema de salud en todo el mundo y es la primera causa de muerte asociada a enfermedades infecciosas, a pesar de la vacunación con BCG y del uso de un gran número de drogas para su control (Dolin PJ, Raviglione MK, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull Who*. 2001; 72: 213).

Se estima que la tercera parte de la población mundial ha sido infectada por el *Mycobacterium tuberculosis*. Cada año 8 millones de personas en todo el mundo desarrollan la TB activa y mueren 3 millones. La coinfección con el Virus de la

Inmunodeficiencia Humana (VIH), representa del 3 al 5% de los casos (Dolin PJ, Raviglione MK, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull Who.* 1994; 72: 213).

Debido a la gran extensión de la enfermedad se requieren del desarrollo de nuevos y mejores métodos diagnósticos, preparados vacunales y agentes terapéuticos (Collins FM. Tuberculosis: The Return of an Old Enemy. *Critical Reviews in Microbiology.* 1993; 19: 1-16).

En cuanto al tratamiento, este se basa en combinaciones de medicamentos, administrados a relativamente altas dosis, por largos períodos de tiempo y con toxicidad asociada, lo cual dificulta la implementación de los programas de tratamiento controlado (McCarthy M. Experts see progress in fight against tuberculosis *Lancet.* 2002; 359:2005). En este sentido, sería deseable la disminución de los tiempos de tratamiento, favoreciendo de esta forma la aplicación de los programas de control y el cumplimiento del mismo, lo que evitaría el surgimiento de cepas resistentes. La disminución de las dosis de los fármacos empleados sería también un elemento de utilidad que disminuiría la toxicidad del tratamiento.

El surgimiento de cepas con resistencia múltiple a drogas es un problema creciente en la actualidad que demanda el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el elevado número de pacientes que las alberga (50 millones) y para el creciente número de casos con estas características que se presentarán en el futuro (McCarthy M, News. Experts see progress in fight against tuberculosis. *Lancet.* 2002; 359:2005; Hopewell PC. Tuberculosis Control: How the world has changed since 1990. *Bull. World Health Org* 2002, 80:427, Freire M, Rosigno G Joining forces to develop weapons against TB: together we must. *Bull. World Health Org* 2002, 80:429).

Adicionalmente, existen múltiples especies de micobacteria que producen enfermedad en el hombre para las que no se cuenta con un tratamiento adecuado.

El BCG es la única vacuna antituberculosa existente actualmente para uso humano. En el mundo han sido administradas alrededor de tres billones de dosis. Su eficacia varía ampliamente dependiendo de la cepa empleada, el estado nutricional, fondo genético, envejecimiento y presencia de infecciones intercurrentes. Se considera que su uso solo es eficaz en la prevención de las formas graves de la enfermedad (miliar y meníngea) en la infancia y que no tiene valor para la prevención de la tuberculosis pulmonar, por lo que es muy urgente la necesidad de desarrollar nuevos preparados vacunales (Hirsch LS,

Johnson-JL, Ellner JJ. Pulmonary tuberculosis. Curr-Opin-Pulm-Med1999;5(3):143-50; Jacobs GG, Johnson JL, Wallis RS. Tuberculosis vaccines: how close to human testing. Tuber Lung Dis 1997;78:159-169; Ginsberg AM. What's new in tuberculosis vaccines? Bull. World Health Org 2002, 80:483).

- 5 Las estrategias mas importantes de desarrollo de vacunas contra la tuberculosis incluyen el uso de cepas inactivadas, cepas atenuadas genéticamente o no, vacunas de ácidos nucleicos, vacunas de subunidades y cepas vivas atenuadas expresando antígenos de *M. tuberculosis*.

10 Las vacunas inactivadas tienen como desventaja el hecho de que por tratarse de microorganismos muertos, estos tienen una capacidad protectora disminuida, debido fundamentalmente por la imposibilidad de persistir "in vivo" y la falta de expresión de proteínas relevantes para la protección como son las proteínas de secreción.

En el caso de las cepas atenuadas genéticamente o no, su principal desventaja es la posibilidad de reversión a la virulencia después de administradas, lo cual genera preocupaciones desde el punto de vista de su seguridad en humanos.

15 Las vacunas de ácidos nucleicos, a pesar de constituir una estrategia promisoría, hasta el momento en general en humanos no han logrado niveles de inmunogenicidad adecuados.

En cuanto a las vacunas de subunidades, por tratarse de componentes purificados a partir del microorganismo u obtenidos por vía recombinante, se plantea que no poseen el mismo potencial de inmunogenicidad que los microorganismos vivos, lo cual dificulta el logro de respuestas protectoras, fundamentalmente en lo referido a la estimulación de respuestas celulares de tipo de células T Auxiliadoras tipo 1 (TH 1).

20 La estrategia de expresión de antígenos de interés vacunal en cepas vivas atenuadas es una de las estrategias más prometedoras en el campo del desarrollo de vacunas de nueva generación contra la tuberculosis, sin embargo, hasta el momento no se han llevado ensayos clínicos con esta variante. Un elemento de importancia de esta estrategia radica en la selección del vector de expresión, que en dependencia de la cepa seleccionada podría implicar complicaciones desde el punto de vista regulatorio similares a las que se confronta con el uso de cepas vivas atenuadas.

30

Descripción de la Invención

Teniendo en cuenta que *Streptomyces* y *M. tuberculosis* pertenecen a la misma clase, que comparten una gran cantidad de genes y antígenos, unido al hecho de la probada inocuidad de *Streptomyces* para el hombre y la amplia utilización que estas bacterias han tenido en la

producción de fármacos para uso humano, así como el amplio desarrollo de métodos de expresión de proteínas heterólogas en este sistema, incluyendo proteínas de *M. tuberculosis*, se diseñó, mediante la presente invención, el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis que emplean como principio activo cepas vivas de *Streptomyces*, las cuales
5 pueden expresar o no antígenos de *M. tuberculosis*, y que son administradas por distintas vías, incluyendo la mucosal.

Las preparaciones vacunales de la presente invención comprenden una variedad de principios activos derivados del microorganismo *Streptomyces*, entre los que se encuentran:

- 10 • *Streptomyces* (cepa salvaje)
- *Streptomyces* recombinante que expresa el antígeno Apa de *M. tuberculosis*

La cepa salvaje utilizada en la presente invención es una cepa industrial, no patógena, de amplia utilización en la producción de medicamentos para el hombre.

Sorprendentemente se observó una marcada inmunogenicidad humoral y celular de las
15 cepas después de su administración por distintas vías. Las respuestas obtenidas se dirigieron contra los antígenos de la cepa utilizada en la inmunización (*Streptomyces*), contra el antígeno de *M. tuberculosis* expresado en la misma (Apa), así como contra otros antígenos de *M. tuberculosis* y BCG (Ejemplo 1), lo cual confirmó la comunidad de antígenos existente entre *Streptomyces* y Micobacteria y la amplia reactividad cruzada de
20 los mismos. Este hecho avaló la posibilidad del uso de estas cepas como vacunas frente a *M. tuberculosis*.

Otro hecho que avala su uso es su incapacidad para colonizar y para causar lesiones histopatológicas en el hospedero, hechos que reafirman su inocuidad (Ejemplo 2)

Estas cepas son aplicables profilácticamente para la prevención de la tuberculosis,
25 quedando demostrado en todas las vías de administración utilizadas, la inducción de un estado de protección frente a *M. tuberculosis* y BCG (Ejemplo 3).

Las composiciones de la presente invención produjeron una disminución significativa de los niveles de infección pulmonar con BCG y *M. tuberculosis* en un modelo de infección en ratones (Ejemplo 3).

30 La presente invención aborda de manera novedosa la prevención de las enfermedades causadas por micobacterias, en particular contra la tuberculosis, a través del empleo de vacunas basadas en cepas de *Streptomyces*. Es de particular novedad el empleo de cepas

de *Streptomyces*, aspecto éste no conocido en modo alguno a partir del estado del arte. Resulta igualmente novedoso que dichas cepas resultaron efectivas tanto por la vía mucosal como parenteral.

- 5 Resultó significativo que las cepas de *Streptomyces* pueden ser utilizadas como vectores vivos de expresión de antígenos de interés vacunal lo cual no ha sido reportado en el estado del arte abriendo la posibilidad de utilización de estas cepas para la expresión de antígenos no micobacterianos permitiendo su uso para la prevención y tratamiento de enfermedades alérgicas, tumorales, autoinmunes y en la prevención del embarazo.

10 **Breve descripción de las figuras.**

Figura 1: Western blot. Tiras de Nitrocelulosa con extractos de *Streptomyces* (1) y BCG (2) fueron estudiados frente a un pool de sueros de animales inmunizados con *Streptomyces* (Grupo 2)

- 15 **Figura 2:** Western blot. Tiras de Nitrocelulosa con extractos de BCG (1) y *Streptomyces* (2) fueron estudiados frente a un pool de sueros de animales inmunizados con BCG (Grupo 3)

Figure 3: Western blot. Tiras de Nitrocelulosa con extractos de BCG (1) y *Streptomyces* (2) fueron estudiados frente a un pool de sueros de animales inmunizados con Solución Salina (Grupo 1)

- 20 **Figure 4:** Experimento de reto con BCG. Los valores representan el logaritmo medio de las CFU/mg de tejido pulmonar. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo inmunizado con *Streptomyces* y los grupos inmunizados con BCG y Solución Salina (SS).

25 **Ejemplos**

La presente invención será descrita a través de los siguientes ejemplos específicos.

Ejemplo 1. Estudio de Inmunogenicidad

Animales:

- 30 Ratones Balb/c machos de 8-10 semanas suministrados por el CENPALAB, Cuba, fueron usados en los experimentos.

BCG

Cepa viva liofilizada de BCG (InterVax, Biological Limited, Canada).

Streptomyces lividans

Cepa 1326, no transformada genéticamente (*Streptomyces*) y transformada expresando la proteína ApA de *Mycobacterium tuberculosis* (*Streptomyces-ApA*).

Esquema de Inmunización

- 5 40 ratones Balb/c fueron divididos en 4 grupos de 10 animales cada uno (Tabla 1).
El Grupo 1 recibió Solución Salina (SS) y fue usado como control.
Los animales de los grupos 2 y 3 recibieron 10^5 CFU de *Streptomyces* por la vía intraperitoneal (IP) con un intervalo de 3 semanas entre las dosis. Los animales del grupo 3 recibieron *Streptomyces-ApA* con el mismo esquema.
- 10 Los animales del grupo 4 se inmunizaron con el mismo protocolo pero utilizando 10^5 CFU de BCG en cada inmunización, 21 días después de la última inmunización se tomaron muestras de sangre de cada animal.

Tabla 1: Estudio de inmunogenicidad

<u>GRUPO</u>	<u>VIA</u>	<u>INOCULO</u>	<u>N</u>
1	IP	SS 200 μ L	10
2		<i>Streptomyces</i> 10^5 CFU	10
3		<i>Streptomyces-ApA</i> 10^5 CFU	10
4		BCG 10^5 CFU	10

15

Western Blot

Extractos proteicos de *Streptomyces*, BCG y la proteína recombinante ApA de *M. tuberculosis* se separaron por SDS-PAGE (Laemmli A, UK. Nature 1970; 227(6): 680-685) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m usando un sistema semiseco (NovaBlot II, Pharmacia, Sweeden).

20

Las membranas se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA) 2% en PBS durante 2 horas a 37°C, fueron lavadas e incubadas por 1 hora a 37 °C e incubadas con pools de suero de los animales de los diferentes grupos diluidos 1:150 en PBS.

Después del lavado las membranas se incubaron durante 1 hora a 37 grados centígrados con un conjugado polivalente anti inmunoglobulinas de ratón (Sigma), diluido 1:1500 y reveladas con Diaminobenzidine y H₂O₂ como sustrato.

El resultado obtenido del estudio de inmunogenicidad demostró la inducción de anticuerpos específicos contra los antígenos de *Streptomyces* en los animales inmunizados con el microorganismo. (Figura 1).

Adicionalmente, los animales inmunizados reconocieron proteínas de BCG, demostrando la reactividad cruzada con micobacterias de la respuesta producida. (Figura 1).

Este resultado es altamente relevante, ya que demuestra el potencial inmunizante de *Streptomyces* contra las micobacterias.

La reactividad cruzada contra *Streptomyces* producida después de la inmunización con BCG también fue demostrada (Figure 2).

El suero de los animales inmunizados con SS no fueron reactivos frente a antígenos de *Streptomyces* o BCG (Figura 3).

El grupo de animales inmunizados con *Streptomyces*-ApA mostraron un similar patrón de respuesta que los animales inmunizados con *Streptomyces* (resultados no mostrados). En este grupo de animales, el reconocimiento de la proteína ApA se demostró por Western Blot (resultado no mostrado).

Este resultado demuestra la capacidad de *Streptomyces* de ser usado como un vector vivo para la expresión de antígenos heterólogos, en particular de *M. tuberculosis*.

Ejemplo 2. Estudio de biodistribución

Animales:

Ratones Balb/c machos de 8-10 semanas suministrados por el CENPALAB, Cuba, fueron usados en los experimentos.

BCG

Cepa viva liofilizada de BCG (InterVax, Biological Limited, Canada).

Streptomyces lividans

Cepa 1326, no transformada genéticamente (*Streptomyces*) y transformada expresando la proteína ApA de *Mycobacterium tuberculosis* (*Streptomyces*-ApA).

El estudio se llevó a cabo con 48 ratones, distribuidos en 8 grupos de 6 animales (Tabla 2)

Los animales del grupo 1 recibieron 200 µl de SS IP y los animales del grupo 5 recibieron 50 µl SS IN.

Los animales de los grupos 2, 3, y 4 recibieron *Streptomyces* en dosis de 10^5 , 10^3 y 10^2 respectivamente en 200 μ l de agua destilada (IP).

Los animales de los grupos 6, 7 and 8 recibieron *Streptomyces* en dosis de 10^3 , 10^2 y 10^1 respectivamente en 50 μ l de agua destilada por la vía intranasal (IN).

- 5 Después de 30 días los animales fueron sacrificados y el corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón fueron estudiados histopatológicamente (3 animales) y microbiológicamente (3 animales).

El estudio histopatológico fue realizado mediante tinción con Hematoxilina y Eosina.

El estudio microbiológico se efectuó utilizando medio YEME (Tobias Kieser, Mervyn J.

- 10 Viv., Mark J. Buttner, Perth F. Charter, David A. Hopwood. Practical *Sytreptomyces* Genetics. Crowes, Norwich. England. 2000).

Tabla 2: Estudio de biodistribucion de *Streptomyces*

<u>GRUPO</u>	<u>VIA</u>	<u>DOSIS</u>	<u>ORGANOS</u>
1	<u>IP</u>	SSF 200 μ L	Corazón Pulmón Hígado Bazo Riñón
2		10^5 CFU	
3		10^3 CFU	
4		10^2 CFU	
5	<u>IN</u>	SSF 50 μ L	
6		10^3 CFU	
7		10^2 CFU	
8		10^1 CFU	

- 15 En el estudio de biodistribución el microorganismo no fue evidente en los órganos estudiados.

El estudio histopatológico no demostró lesiones en los órganos estudiados. Resultados similares se obtuvieron con *Streptomyces-ApA* (resultado no mostrado).

Tomando en consideración estos estudios, podemos concluir que *Streptomyces* es seguro,

- 20 demostrándose la posibilidad de su uso como vacuna viva sin efectos adversos.

Debe destacarse que además de seguras estas cepas inducen una adecuada respuesta inmune (**Figura 1**).

Ejemplo 3. Experimentos de reto

- 25 **Animales:**

Ratones Balb/c machos de 8-10 semanas suministrados por el CENPALAB, Cuba, fueron usados en los experimento.

BCG

- 5 Cepa viva liofilizada de BCG (InterVax, Biological Limited, Canada).

Streptomyces lividans

Cepa 1326, no transformada genéticamente (*Streptomyces*) y transformada expresando la proteína ApA de *Mycobacterium tuberculosis* (*Streptomyces-ApA*).

Fueron estudiados 26 animales distribuidos en 3 grupos (Tabla 3).

- 10 Los animales fueron inmunizados IP en 3 oportunidades con intervalos de 2 semanas. El Grupo 1 con SS, el Grupo 2 con 10^5 CFU de *Streptomyces* y el Grupo 3 con 10^5 CFU de BCG.

3 semanas después de la última inmunización los animales fueron retados con 0.5×10^6 CFU de BCG IN. 24 horas después los animales fueron sacrificados y los pulmones

- 15 extraídos para estudios microbiológicos.

Estudios microbiológicos.

Los macerados de pulmón fueron sembrados en Medio Ogawa (Manual de la OXID. Cuarta Edición. 1981 Editado por OXID Limited, England) e incubados por 28 días a 37°C . Después del periodo de incubación, las CFU fueron contadas y el número de

- 20 CFU/mg de tejido determinadas.

Procesamiento estadístico

La comparación estadística entre los grupos se hizo con el método de Kruskal-Wallis y la prueba de Comparaciones Múltiples de distribución libre.

25 **Tabla 3: Experimento de Reto**

<u>GRUPO</u>	<u>Inoculación</u> 0, 21 y 42 días	<u>Día del Reto</u> 63	<u>N</u>
1	SS 200 μL	BCG 0.5×10^6 CFU	8
2	<i>Streptomyces</i> 10^5 CFU		10
3	BCG 10^5 CFU		8

En el grupo inmunizado con *Streptomyces* hubo una disminución significativa en las CFU de BCG en los pulmones comparados con los grupos inmunizados con BCG y SS (Figura 4). Resultados similares se obtuvieron con el grupo inmunizado con *Streptomyces-ApA* (resultados no mostrados).

- 5 Los animales inmunizados con *Streptomyces* y *Streptomyces-ApA* fueron protegidos frente al reto con *M. tuberculosis* (resultados no mostrados).

Los resultados anteriores demuestran la capacidad protectora de *Streptomyces* contra micobacterias y apoyan su uso como vacunas para la prevención de las infecciones por micobacterias.

10

Ventajas de la solución propuesta.

El uso de este tipo de cepas como vacunas frente a las infecciones por micobacterias en especial frente a la tuberculosis tiene como ventajas el uso de cepas no patógenas lo que permite el uso de las cepas vivas en humanos, lo cual garantiza una adecuada

- 15 inmunogenicidad y estimulación de las respuestas inmunes relevantes para la protección.

Otra ventaja de este tipo de cepas es el amplio conocimiento de su genética y el elevado grado de desarrollo de los métodos de transformación genética y de expresión en altos niveles de proteínas heterólogas en estos hospederos entre las que se incluyen las de *M. tuberculosis* lo que permite el desarrollo de cepas de *Streptomyces* expresando altos

- 20 niveles de proteínas de *M. tuberculosis*, de preferencia en forma secretada lo que garantiza una elevada inmunogenicidad y capacidad protectora.

Otra de las ventajas radica en la amplia experiencia que existe con el uso industrial de estas cepas para la producción de medicamentos de uso humano lo que garantiza la producción industrial de estas vacunas.

- 25 En el caso particular de infecciones por micobacterias la demostración de la capacidad protectora de la administración por vía de mucosas asegura la inducción de respuestas protectoras a nivel de la puerta de entrada del microorganismo. La vía de administración mucosal asegura una vía fácil y versátil de aplicación en el sitio de entrada de estos microorganismos, favoreciendo el bloqueo de la infección y por lo tanto el efecto profiláctico.

30

Otra de las ventajas es el amplio espectro de actividad contra distintos tipos de micobacteria demostrado por la protección inducida frente a *M. tuberculosis* y BCG, lo

que garantiza su uso para la prevención de un amplio espectro de enfermedades por micobacterias.

También las cepas de *Streptomyces* transformadas genéticamente y expresando antígenos de interés vacunal no micobacterianos pueden ser utilizadas para la profilaxis o terapéutica
5 de enfermedades infecciosas no micobacterianas, autoinmunes, alérgicas, tumorales, así como la prevención del embarazo.

Reivindicaciones

1. Composiciones vacunales obtenidas a partir *Streptomyces* caracterizadas porque comprenden como principio activo una o más cepas salvajes del género *Streptomyces*
5 o cepas mutantes o recombinantes derivadas de las mismas, así como un excipiente apropiado.
2. Composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque dichas cepas de *Streptomyces* son cepas vivas.
10
3. Composición vacunal según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizada porque dichas cepas de *Streptomyces* son *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces Sp.*
- 15 4. Composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque dichas cepas recombinantes de *Streptomyces* expresan uno o más antígenos heterólogos de interés vacunal.
5. Composición vacunal según la reivindicación 4 caracterizada porque dichas cepas recombinantes de *Streptomyces* expresan uno o más antígenos de *Mycobacterium*.
20 *Tuberculosis*
6. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención o terapéutica de enfermedades infecciosas.
25
7. Uso según la reivindicación 6 para la prevención o terapéutica de infecciones causadas por micobacterias.
8. Uso según la reivindicación 7 para la prevención o terapéutica de la tuberculosis.
30

9. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención o terapéutica de enfermedades tumorales.
10. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la
5 prevención o terapéutica de enfermedades autoinmunes.
11. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención o terapéutica de enfermedades alérgicas.
- 10 12. Uso de la composición vacunal de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la prevención del embarazo

Figura.1

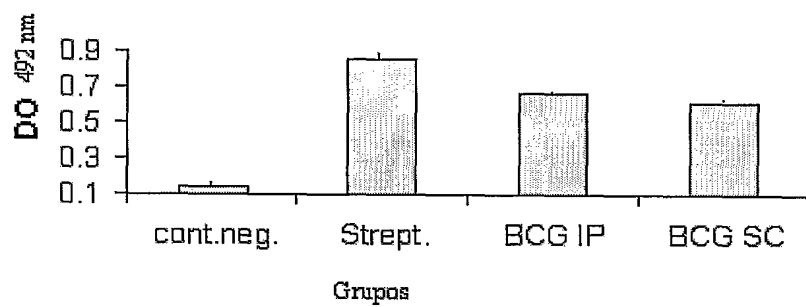


Figura 2

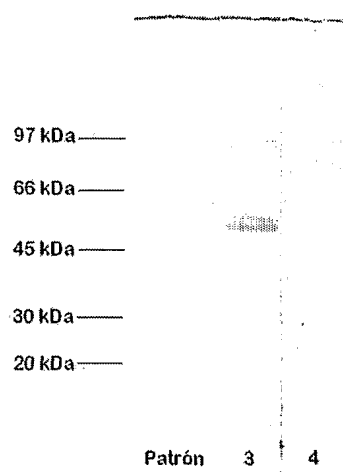


Figura 3

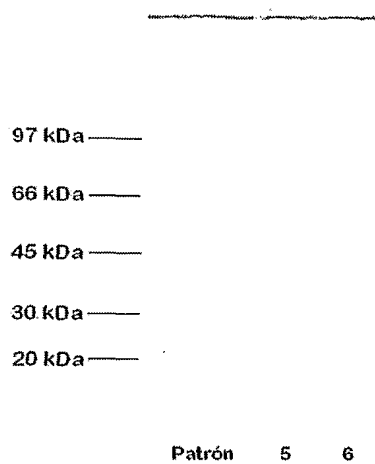
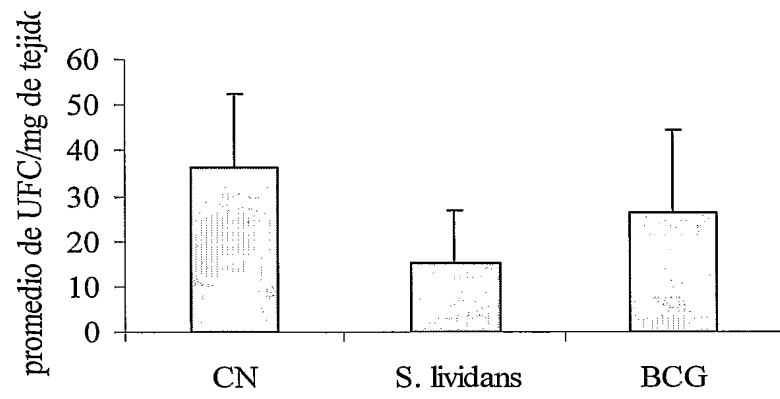


Figure 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In ☐ International Application No
PCT/CU2005/000002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/00 A61K39/04 A61P37/00 A61P35/00 A61P15/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200379 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2003-849754 XP002334575 KIM C J ET AL.: "Microorganism Streptomyces sp. amlk-335 producing cyclo(proline-phenylalanine) and cyclo(leucine-proline) useful for preparing an antimicrobial and anticancer composition" & KR 2003 055 089 A (KOREA RES INST BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOG) 2 July 2003 (2003-07-02) abstract ----- -/--	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 July 2005		Date of mailing of the international search report 14/07/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CU2005/000002

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 962 532 A (INNOGENETICS N.V.) 8 December 1999 (1999-12-08) page 7, paragraph 47 page 10, paragraph 83 - paragraph 86 -----	1-12
A	EP 0 148 552 A (BIOGEN N.V.) 17 July 1985 (1985-07-17) page 1, line 5 - line 15 page 4, line 5 - line 29 page 6, line 1 - line 33 page 16, line 8 - line 23 -----	1-12
A	DONALD TREMBLAY ET AL.: "High-level heterologous expression and secretion in Streptomyces lividans of two major antigenic proteins from Mycobacterium tuberculosis" CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 48, 2002, pages 43-48, XP002334573 abstract page 43, left-hand column, paragraph 1 - page 44, right-hand column, paragraph 1 -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CU2005/000002

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 6-12 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/CU2005/000002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 2003055089	A	02-07-2003	NONE	
EP 0962532	A	08-12-1999	EP 0962532 A1	08-12-1999
EP 0148552	A	17-07-1985	AU 2991884 A	10-01-1985
			CA 1222709 A1	09-06-1987
			EP 0148552 A1	17-07-1985
			JP 60186289 A	21-09-1985

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2005/000002

<p>A. CLASIFICACION DE LA INVENCION</p> <p>CIP 7 : A61K39/00 A61K39/04 A61P37/00 A61P35/00 A61P15/00</p> <p>Según la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o la clasificación nacional y la IPC</p>								
<p>B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA</p> <p>Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)</p> <p>CIP 7 : A61K A61P</p> <p>Otra documentación consultada además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda</p> <p>Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)</p> <p>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS</p>								
<p>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Categoría*</th> <th>Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes</th> <th>N° de las reivindicaciones pertinentes</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td> <p>DATABASE WPI</p> <p>Section Ch, Week 200379</p> <p>Derwent Publications Ltd., London, GB;</p> <p>Class B04, AN 2003-849754</p> <p>XP002334575</p> <p>KIM C J ET AL.: "Microorganism Streptomyces sp. amk-335 producing cyclo(proline-phenylalanine) and cyclo(leucine-proline) useful for preparing an antimicrobial and anticancer composition"</p> <p>& KR 2003 055 089 A (KOREA RES INST BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOG)</p> <p>2 July 2003 (2003-07-02)</p> <p>abstract</p> <p>-----</p> <p>-/--</p> </td> <td>1-12</td> </tr> </tbody> </table>			Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes	A	<p>DATABASE WPI</p> <p>Section Ch, Week 200379</p> <p>Derwent Publications Ltd., London, GB;</p> <p>Class B04, AN 2003-849754</p> <p>XP002334575</p> <p>KIM C J ET AL.: "Microorganism Streptomyces sp. amk-335 producing cyclo(proline-phenylalanine) and cyclo(leucine-proline) useful for preparing an antimicrobial and anticancer composition"</p> <p>& KR 2003 055 089 A (KOREA RES INST BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOG)</p> <p>2 July 2003 (2003-07-02)</p> <p>abstract</p> <p>-----</p> <p>-/--</p>	1-12
Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes						
A	<p>DATABASE WPI</p> <p>Section Ch, Week 200379</p> <p>Derwent Publications Ltd., London, GB;</p> <p>Class B04, AN 2003-849754</p> <p>XP002334575</p> <p>KIM C J ET AL.: "Microorganism Streptomyces sp. amk-335 producing cyclo(proline-phenylalanine) and cyclo(leucine-proline) useful for preparing an antimicrobial and anticancer composition"</p> <p>& KR 2003 055 089 A (KOREA RES INST BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOG)</p> <p>2 July 2003 (2003-07-02)</p> <p>abstract</p> <p>-----</p> <p>-/--</p>	1-12						
<table border="1"> <tr> <td> <p><input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.</p> <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente</p> <p>"E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada</p> </td> <td> <p><input checked="" type="checkbox"/> Véase el Anexo de la familia de patentes.</p> <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención</p> <p>"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente</p> <p>"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes</p> </td> </tr> </table>			<p><input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.</p> <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente</p> <p>"E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Véase el Anexo de la familia de patentes.</p> <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención</p> <p>"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente</p> <p>"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes</p>				
<p><input checked="" type="checkbox"/> En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales.</p> <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica que no se considera como particularmente pertinente</p> <p>"E" documento anterior, publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada</p>	<p><input checked="" type="checkbox"/> Véase el Anexo de la familia de patentes.</p> <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención</p> <p>"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente</p> <p>"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes</p>							
<p>Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional</p> <p>5 /07/ 2005</p>		<p>Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional</p> <p>14/07/2005</p>						
<p>Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional</p> <p>O.E.P</p>		<p>Funcionario autorizado</p>						
<p>Facsímil N°</p>		<p>Teléfono N°</p>						

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2005/000002

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando sea adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	<p>EP 0 962 532 A (INNOGENETICS N.V.) 8 diciembre 1999 (1999-12-08) pagina 7, parafo 47 pagina 10, parafo 83 - parafo 86</p>	1-12
A	<p>EP 0 148 552 A (BIOGEN N.V.) 17 July 1985 (1985-07-17) pagina 1, linea 5 - linea 15 pagina 4, linea 5 - linea 29 pagina 6, linea 1 - linea 33 pagina 16, linea 8 - linea 23</p>	1-12
A	<p>DONALD TREMBLAY ET AL.: "High-level hetologous expression and secretion in Streptomyces lividans of two major antigenic proteins from Mycobacterium tuberculosis" CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, vol. 48, 2002, pages 43-48, XP002334573 abstract page 43, left-hand column, parafo 1 - page 44, column derecha , parato 1</p>	1-12

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU2005/000002

Recuadro I Observaciones cuando no han podido efectuarse búsquedas sobre ciertas reivindicaciones (continuación del punto 1 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha establecido respecto de ciertas reivindicaciones, en virtud del Artículo 17.2)a), por las razones siguientes:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
debido a que se refieren a objetos para los que no se ha solicitado a esta Administración su búsqueda, concretamente:

Although claims 6-12 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con las exigencias prescritas, de forma que no puede realizarse una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones Nos.:
debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta la unidad de la invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha encontrado invenciones múltiples en esta solicitud internacional, como se indica a continuación:

1. ☐ Debido a que todas las tasas adicionales de búsqueda exigidas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones para las que puede efectuarse la búsqueda.
2. ☐ Debido a que puede efectuarse la búsqueda respecto de todas las reivindicaciones susceptibles de búsqueda sin esfuerzo que justifique una tasa adicional, esta Administración no invita a pagar ninguna tasa adicional.
3. ☐ Debido a que sólo algunas de las tasas adicionales de búsqueda requeridas fueron pagadas en su momento por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca únicamente las reivindicaciones para las que fueron pagadas las tasas, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó en su momento las tasas adicionales de búsqueda requeridas. En consecuencia, este informe de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; abarca las reivindicaciones Nos.:

Observación sobre protesta ☐ Las tasas de búsqueda adicional fueron acompañadas por protesta del solicitante.
☐ Ninguna protesta acompañó al pago de las tasas de búsqueda adicional.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/CU2005/000002

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
KR 2003055089 A	02-07-2003	NINGUNO	
EP 0962532 A	08-12-1999	EP 0962532 A1	08-12-1999
EP 0148552 A	17-07-1985	AU 2991884 A	10-01-1985
		CA 1222709 A1	09-06-1987
		EP 0148552 A1	17-07-1985
		JP 60186289 A	21-09-1985